

学位論文題名

古細菌 *Pyrobaculum calidifontis* のチアミン生合成経路の酵素学的研究

Enzymatic study of thiamin biosynthetic pathway in the archaeon *Pyrobaculum calidifontis*

学位申請者 林 麻利亜 ㊦

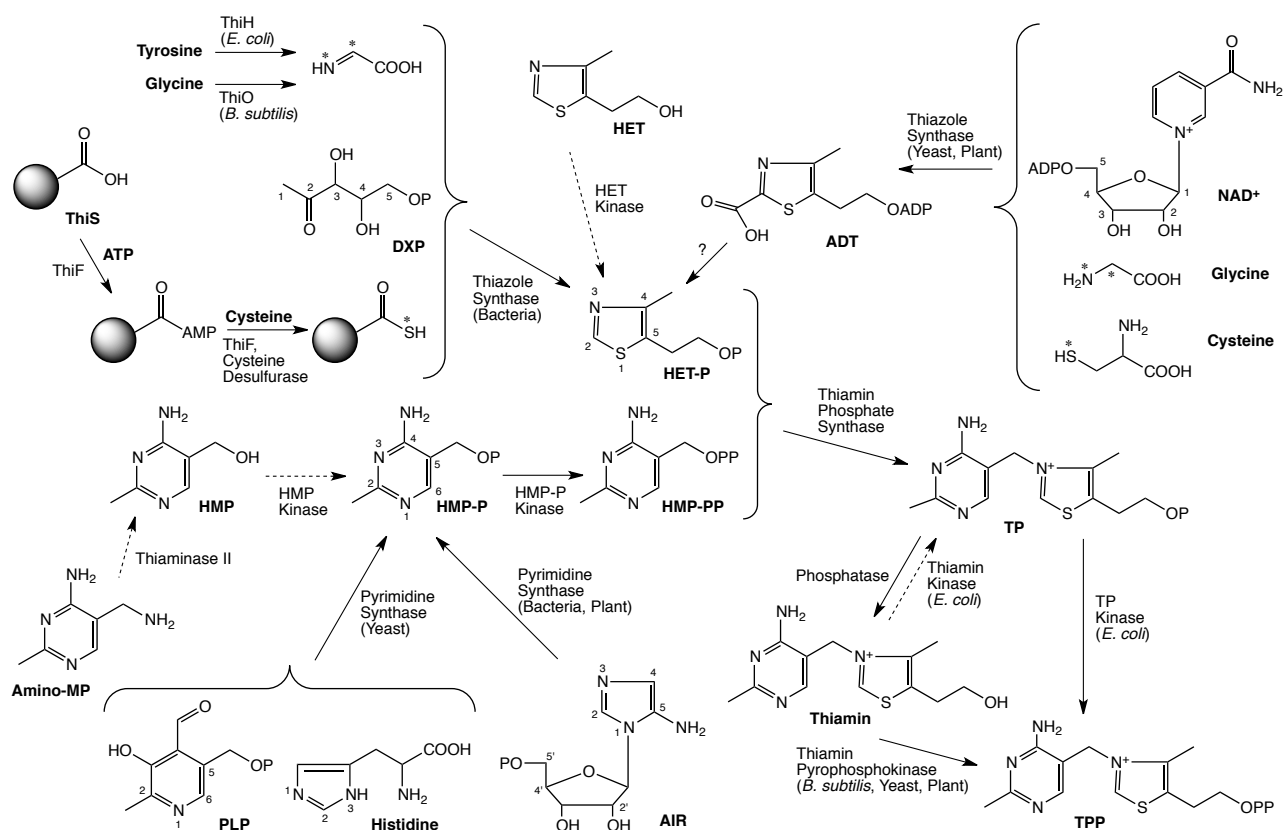
諸言

水溶性ビタミンに分類されるチアミン（ビタミン B₁）は動物、植物、および微生物中に遊離のチアミンあるいはリン酸エステルとして広く存在している。リン酸エステルには、チアミンリン酸 thiamin phosphate、チアミン二（ピロ）リン酸 thiamin pyrophosphate、チアミン三リン酸 thiamin triphosphate があり、そのうちチアミンピロリン酸が主に糖代謝やアミノ酸代謝に関与する補酵素として作用している¹⁾。ヒトの欠乏症として脚気やウェルニッケ脳症が有名であるが、前者が末梢神経系と循環器系に、後者が中枢神経系に主症状が認められ、同じチアミン欠乏症でありながらこれら症状の違いがどのような機構によるものか現在のところ不明である。また、いずれも神経症状が顕著であることから、補酵素以外のチアミンの生理作用を神経機能に見いだそうとする研究者もいる¹⁾。

チアミン生合成経路の研究は、これまで真正細菌、酵母、植物などで成されてきた。現在まで明らかになったチアミンピロリン酸生合成経路を Fig. 1 に示す^{2), 3)}。チアミンを *de novo* で生合成できる全ての生物において、ピリミジン部およびチアゾール部は独立した経路で別々に合成され、それぞれのリン酸エステル化合物が縮合してチアミン骨格が形成される。真正細菌と酵母とではピリミジン部とチアゾール部の生合成経路は異なる。植物では、ピリミジン部は真正細菌と同様の経路で合成される一方で、チアゾール部は酵母の経路で合成される。また、チアミンの分解で生じたピリミジン部やチアゾール部、さらにチアミンそのものをリン酸化してチアミンピロリン酸の生成に利用するサルベージ酵素も存在する。興味深いことに、酵母や植物のチアミン生合成酵素遺伝子には、真正細菌では 2 つの遺伝子として存在しているものが 1 つの遺伝子に融合された構造をとっているものがある。これは、連続する反応を触媒する酵素が 1 つの遺伝子にコードされることで、より効率的なチアミン合成が可能になるように進化したものと考えられる。これらチアミンの生合成経路には、これまでに類のない複雑で新規な生化学反応も含まれており、酵素反応機構についても未解決な部分が残されている。また、ヒトはチアミンを合成する酵素を持たないため、細菌のチアミン生合成系酵素は抗菌剤のターゲットになる可能性がある。今後、微生物のチアミン生合成に関する分子レベルでの研究成果が新規の抗菌剤開発に応用されることが期待されている^{4), 5)}。

1970 年代後半から 16S rRNA 配列に基づいた進化系統樹を作成することにより、生物は真核生物、真正細菌、古細菌の三つのドメインに分類されるようになった。古細菌は、代謝経路は真正細菌と類似し、遺伝子の翻訳機構などについては真核生物と類似した経路を持つことが知られ

ている⁶⁾。古細菌の多くは、温泉や火山、深海底、低温、酸性、アルカリ性などの特殊な環境下で生息する極限環境微生物である。このような微生物が産生する極限酵素は特殊な条件下でも安定なために産業用酵素として重要性が高まっている。また、研究室での扱いも容易であり、真正細菌や真核生物の類似酵素や新規酵素が多数存在することから、タンパク質の構造研究にもしばしば使用されている。さらに、古細菌はヒトへの病原性はないとの考えが一般的であったが、最近、古細菌の感染による脳脊髄炎が報告され⁷⁾、医療の観点からも注目を受けている。



実線は *de novo* 経路を、破線はサルベージ経路を示す。また以下の略語を用いた。

第1章 好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* のチアミン生合成経路におけるチアゾール部前駆体の同定⁸⁾

チアミンのチアゾール部の生合成経路は、真正細菌と真核生物とは異なり、また真正細菌の中でも通性嫌気性菌と好気性菌では前駆体が一部異なっている⁹⁾。大腸菌のような通性嫌気性菌においては、チアゾール部はチロシン、システイン、1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate に由来し、6種類の酵素が関与している (Fig. 1)。そのうちの ThiG が細菌型チアゾール合成酵素と呼ばれている²⁾。また、枯草菌のような好気性菌では、チロシンの代わりにグリシンが前駆体として利用されている。一方、酵母や植物のような真核生物においては、チアゾール部はグリシン、システイン、NAD⁺から合成される (Fig. 1)。この反応では、チアゾールの5炭素ユニットはNADのリボース部分が由来とされ、酵母型チアゾール合成酵素と呼ばれるただ1種類の酵素 (Thi4) がその合成に関わっている¹⁰⁾。このように、真正細菌の好気性菌と真核生物とで前駆体には共通な部分もあるが、チアゾール部生合成に関係する酵素と反応メカニズムは明らかに違っている。興味深いことに、原核生物でありながら、古細菌のゲノムには酵母型のチアゾール合成酵素遺伝子 *thi4* と相同性のある遺伝子が存在し、細菌型チアゾール合成酵素遺伝子 *thiG* の相同配列は見当たらない^{11), 12)}。本章では、好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* におけるチアミンのチアゾール部前駆体が、真核生物型のグリシンと通性嫌気性菌型のチロシンのいずれであるのかをトレーサー実験によって検討した。

H. salinarum は Grey and Fitt's 培地に基づいた合成培地¹³⁾で、好氣的条件下、4日間、37°Cで[2-¹³C]グリシン、[¹⁵N]グリシン、L-[¹⁵N]チロシンのいずれかをそれぞれ加え培養した。菌体内チアミンはピリミジン部とチアゾール部に分解し、チアゾールをトリフルオロ誘導体化した後、GC-MSを使って分析した。アミノ酸はエトキシカルボニルエチルエステルに誘導体化¹⁴⁾し、同様にGC-MSで分析した。その結果、[2-¹³C]グリシンの標識取り込み率は、チアゾールに37.0%、タンパク質中のグリシンに33.3%、タンパク質中のチロシンに1.27%であり、チアゾールとタンパク質中のグリシンの取り込み率はほぼ一致した (Table 1)。同様に、[¹⁵N]グリシンの標識取り込み率は、チアゾールに35.7%、タンパク質中のグリシンに40.7%、タンパク質中のチロシンに1.26%であった。一方、L-[¹⁵N]チロシンの28.0%は細胞内に取り込まれたが、チアゾールに取り込まれなかった。また、GC-MSのスペクトルから、グリシンのN原子とC-2原子が *H. salinarum* のチアゾールのN原子とC-2原子に取り込まれたことが明らかになった (Fig. 1)。以上の結果と *thi4* 相同遺伝子の存在を考え合わせて、*H. salinarum* におけるチアミンのチアゾール部は酵母型チアゾール合成酵素により合成されるものと考えられた。

Table 1. Incorporation of [2-¹³C]glycine, [¹⁵N]glycine and L-[¹⁵N]tyrosine into the thiazole of thiamin in *H. salinarum*. The rates of incorporation of thiazole and the amino acids glycine and tyrosine in the cell were measured by GC-MS. The incorporation rates were calculated by subtracting the natural abundance ratios of thiazole or amino acids, respectively.

Tracer	Incorporation rate of tracer (%)		
	Thiazole	Protein	
		Glycine	L-Tyrosine
[2- ¹³ C]glycine	37.0	33.3	1.27
[¹⁵ N]glycine	35.7	40.7	1.26
L-[¹⁵ N]tyrosine	0.0	0.0	28.0

本稿では遺伝子はイタリックフォントで、遺伝子産物は標準フォントで1文字目を大文字にして示した。

第2章 超好熱性古細菌 *Pyrobaculum calidifontis* のチアミンリン酸合成酵素の酵素学 的および構造学的性質¹⁵⁾

真正細菌や真核生物で明らかになったチアミン生合成経路では、2-メチル-4-アミノ-5-ヒドロキシメチルピリミジン (HMP) と 4-メチル-5-β-ヒドロキシエチルチアゾール (HET) がそれぞれ独立した経路で合成され、それらのリン酸化エステル化合物である HMP ピロリン酸 (HMP-PP) と HET リン酸 (HET-P) の縮合によってチアミンリン酸としてチアミン骨格が形成される (Fig. 2)^{2), 3)}。この縮合反応は、チアミンリン酸合成酵素 *thiamin phosphate synthase* によって触媒される。チアミンリン酸合成酵素は *thiE* (大腸菌)¹⁶⁾やその相同遺伝子 (ortholog gene) にコードされており (Fig. 2)、酵母¹⁷⁾や植物¹⁸⁾では他のチアミン生合成酵素との融合遺伝子として存在している。一方、多くの古細菌ゲノム配列には *thiE* と相同性のある遺伝子が見あたらない。その代わりに、HMP を2段階でリン酸化する HMP キナーゼ/HMP リン酸キナーゼをコードする *thiD* のC末側に *thiN* と注釈 (annotation) された配列が存在している^{11), 12)}。チアミン生合成経路において HMP リン酸キナーゼとチアミンリン酸合成酵素は連続する反応であることから、植物の融合遺伝子 *thiDE* のように古細菌の融合遺伝子 *thiDN* も同様のタンパク質をコードすることが考えられる。ただし、*thiN* の翻訳産物と ThiE はアミノ酸配列を全く共有していない。本章では、まず、古細菌においてもチアミンがピリミジン部とチアゾール部の縮合によって生成することを、超好熱性古細菌 *Pyrobaculum calidifontis* を用いて確認した。次いで、同菌の組換え ThiN を用いて、ThiN が ThiE と全く同じチアミンリン酸合成酵素活性を発現することを証明し、その酵素学および構造学的性質を検討した。

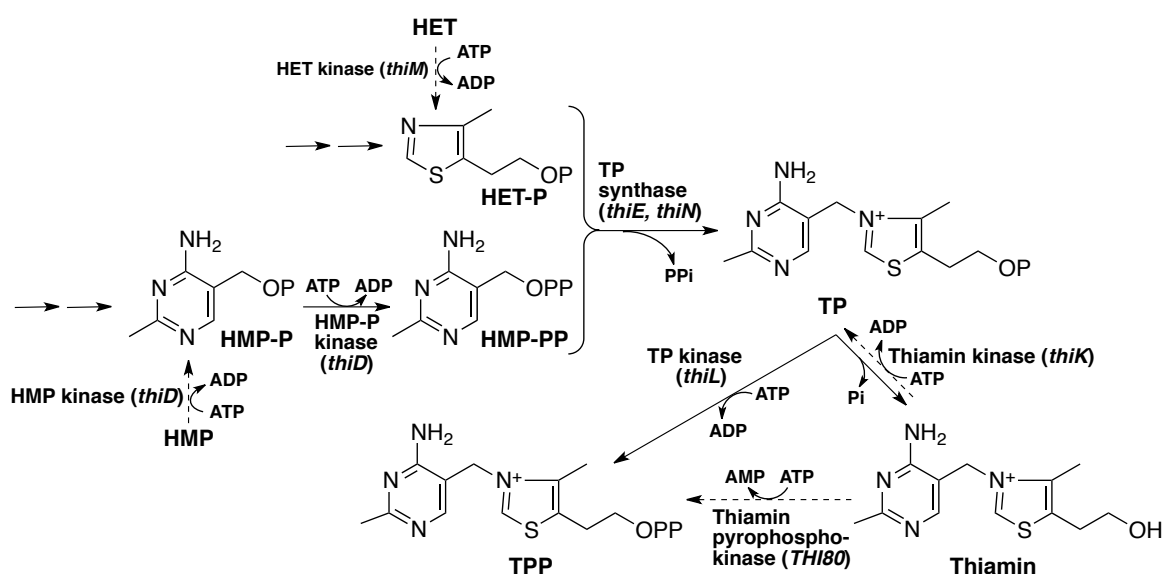


Fig. 2 The later steps in the biosynthesis of thiamin. Genes are indicated in italics. Dashed arrows indicate salvage reaction.

第1節 *P. calidifontis* の粗酵素抽出液によるチアミン合成

真正細菌や真核生物のように、古細菌においてもチアミン骨格がピリミジン部およびチアゾール部の縮合から形成されることを確認するため、HMP、HET、ATP、MgCl₂ と *P. calidifontis* の粗酵素抽出液を反応させることでチアミンあるいはそのリン酸エステルが生成されるかどうかを検討した。なお、反応液中のチアミンやリン酸エステル類は、フェリシアン化カリウムによ

てチオクロムに変換し、HPLC によってそれらの蛍光を分離定量した¹⁹⁾。その結果、85°C で 60 分以上インキュベートしても、チアミン化合物は反応溶液中に検出されなかった。そこで、HMP および HET の代わりに、それらのリン酸エステルを反応に用いたところ、Fig. 3 に示すように、HMP-PP および HET-P を含む溶液中でチアミンリン酸が検出され、その含有量は時間とともに著しく増加した。また、生成量は少ないが、HMP あるいは HMP-P と HET-P を組み合わせた時に、チアミンリン酸の生成が有意に検出された。この結果は、チアミンリン酸合成酵素および HMP キナーゼ/HMP-P キナーゼが *P. calidifontis* の粗酵素抽出液に含まれていることを示唆している。しかしながら、ATP 存在下であるにもかかわらず、リン酸化されていない HET を HMP-PP と反応させてもチアミンリン酸は全く検出されなかった。つまり、HET のリン酸化は起こらなかったものと考えられた。この知見と、HET キナーゼ遺伝子 (*thiM*, Fig. 2) の相同配列がゲノムに見あたらないことから、本古細菌には HET を HET-P にリン酸化するサルベージ酵素は欠如しているものと思われた。

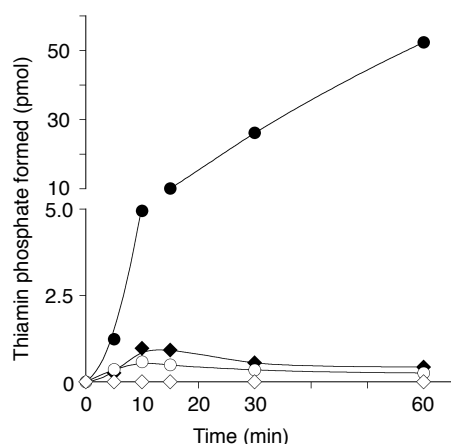


Fig. 3 Thiamin phosphate synthesis from a thiazole and a pyrimidine moiety by the cell-free extract of *P. calidifontis*. The amount of protein used was 30 μ g. The amounts of thiamin phosphate in the reaction mixture (50 μ l) are shown. Each value is the mean from two experiments. Symbols indicate the following combinations of substrates: closed circle, HMP-PP and HET-P; closed diamond, HMP-P and HET-P; open circle, HMP and HET-P; open diamond, HMP-PP and HET.

第2節 組換え ThiDN および ThiN のチアミン合成能力

P. calidifontis のゲノムには HMP キナーゼ/HMP-P キナーゼの推定遺伝子 *thiD* の C 末側に *thiN* が融合した *thiDN* が存在している。粗酵素抽出液を用いた実験結果から、本菌にチアミンリン酸合成酵素および HMP キナーゼ/HMP-P キナーゼが存在することが示唆されたため、*P. calidifontis* の *thiDN* (GenBank: CP000561) および *thiN* 領域のみの組換えタンパク質の調製を試みた。ThiDN (449 アミノ酸) および ThiN (*thiDN* の C 末端 195 アミノ酸) は、それぞれ N 末端にヒスチジンタグを付加して大腸菌で発現させ、Co²⁺イオンアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。ThiN は、可溶性画分中に容易に発現され、100 ml の培地から約 0.5 mg の精製タンパク質を得ることができた。一方、ThiDN は、主に不溶性な封入体中に発現されていたため、可溶性画分を集めることで約 50 μ g の精製タンパク質を得た。SDS-PAGE では、ThiDN (52 kDa) および ThiN (25 kDa) のいずれもアミノ配列から推定される位置にほぼ単一のバンドとして検出された (Fig. 4)。また、ゲル濾過クロマトグラフィーによって ThiDN の相対分子質量は 110,000 と推測されたことから、本タンパク質はホモダイマーとして存在していることが示唆された。

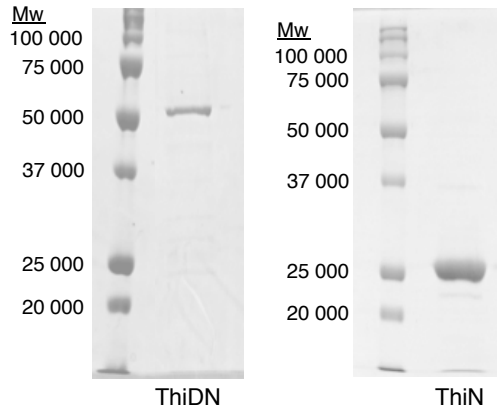


Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the purified proteins. Purified fractions (2 μ g of protein) of histidine-tagged ThiDN (1 μ g of protein) and ThiN (5 μ g of protein) were analyzed using 12.5% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining.

次に、両組換えタンパク質の HMP、HET およびそれらのリン酸エステルからのチアミン合成活性を検討した。まず、基質として HMP-PP および HET-P を用いた時、ThiN では顕著なチアミンリン酸生成が認められ、ThiN がチアミンリン酸合成酵素活性を発現していることが強く示唆された。また、ThiDN でもチアミンリン酸が生成したが、比活性は ThiN のおよそ 5 分の 1 であった (Fig. 5A)。これは、ThiDN が大腸菌細胞内で発現される間に適切な立体構造が部分的に失われたものと思われる。次に、基質として HMP と HET-P、または HMP-P と HET-P のペアを用いると、ThiDN では予想通りチアミンリン酸の生成が認められたが (Fig. 5B)、ThiDN の代わりに ThiN を酵素源として用いると、チアミンリン酸は反応液中に全く検出されなかった。これらの結果から、古細菌の ThiDN 融合タンパク質がチアミンリン酸合成経路の最終段階にあたる 3 つの連続する反応 (Fig. 2) を触媒する多機能酵素であることが明らかとなった。すなわち、ThiDN の N 末側の ThiD 領域が HMP キナーゼおよび HMP-P キナーゼ活性を担い、C 末側の ThiN 領域がチアミンリン酸合成酵素活性を発現する。この構成は、HMP キナーゼ/HMP-P キナーゼで生じる HMP-PP が効率的にチアミンリン酸合成に利用されることを可能にしている。

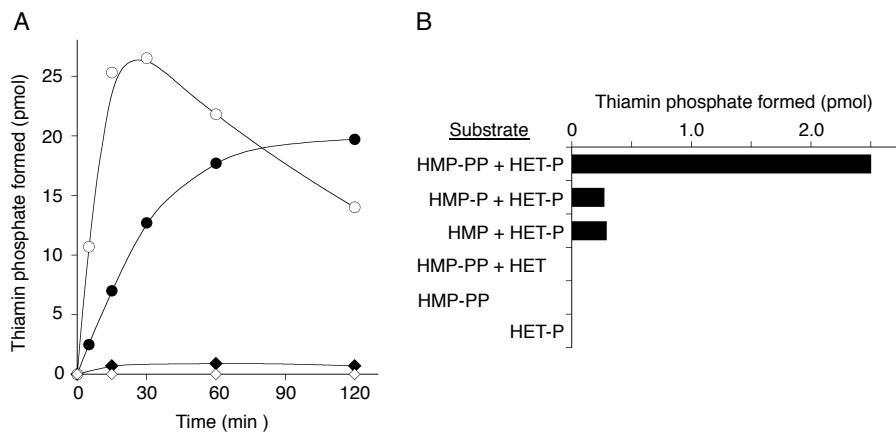


Fig. 5 Thiamin phosphate synthesis from a thiazole and a pyrimidine moiety by the recombinant protein. The starting concentrations of substrates were 10 μ M. The amounts of thiamin phosphate in the reaction mixture (50 μ l) are shown. Each value is the mean from two experiments. (A) Thiamin phosphate synthesis from HET-P with HMP-PP or HMP by ThiDN and ThiN. Note that the hydrolysis of thiamin phosphate to release HMP and HET-P should occur to some extent during the incubation. Symbols indicate the following combination of proteins and substrates: closed circle, ThiDN with HMP-PP and HET-P; open circle, ThiN with HMP-PP and HET-P; closed diamond, ThiDN with HMP and HET-P; open diamond, ThiN with HMP and HET-P. (B) Thiamin phosphate synthesis from different combinations of thiazole and pyrimidine moieties by ThiDN. The amounts of thiamin phosphate in the reaction mixture after 5 min incubation are presented.

第3節 組換え ThiN タンパク質のチアミンリン酸合成酵素活性の酵素学的性質

ThiDN の ThiN 領域がチアミンリン酸合成酵素活性を発現することが明らかとなったため、その酵素学的性質を組換え ThiN を用いて検討した。まず、熱安定性を調べたところ、100°C、5 分の加温では 80%の活性を保持していたが、同温度、15 分の前処理では約 50%の活性が消失し、2 時間の前処理で活性はわずか 10%しか残存しなかった。なお、一価の金属イオンが酵素の熱安定性を改善することがあるが、酵素反応液に 0.5M NaCl を添加しても熱安定性は変化しなかった。このように、超好熱性古細菌由来のタンパク質であるにもかかわらず組換え ThiN は熱に不安定であるが、菌細胞内では本タンパク質の高次構造の維持をサポートする因子が存在する可能性も考えられる。次に、チアミンリン酸合成酵素活性に及ぼす温度、pH および二価金属イオンの影響を検討した。ThiN のチアミンリン酸合成酵素活性は、80°C から温度を上げるに従い上昇し、110°C 付近で最も高い活性が観察され (Fig. 6A)、100°C での活性は最大活性の約 75%であった。最適 pH は 8.5 付近で、pH 7.5 における活性は pH 8.5 の活性の約 60%であった (Fig. 6B)。また、本酵素は二価金属イオンを活性発現に必要とし、試みたイオンのなかで Mg^{2+} が最も高い活性を発揮させた (Fig. 6C)。チアミン構造は、アルカリ条件下で HMP と HET に加水分解されやすく特に高温状態で顕著である。それ故、以後の実験では、 Mg^{2+} 存在下、100°C、pH 7.5 の条件でチアミンリン酸合成酵素活性を測定することにした。なお、本条件でもチアミンは 30 分間に約 20% の割合で分解するため、反応時間は 2 分で実施した。

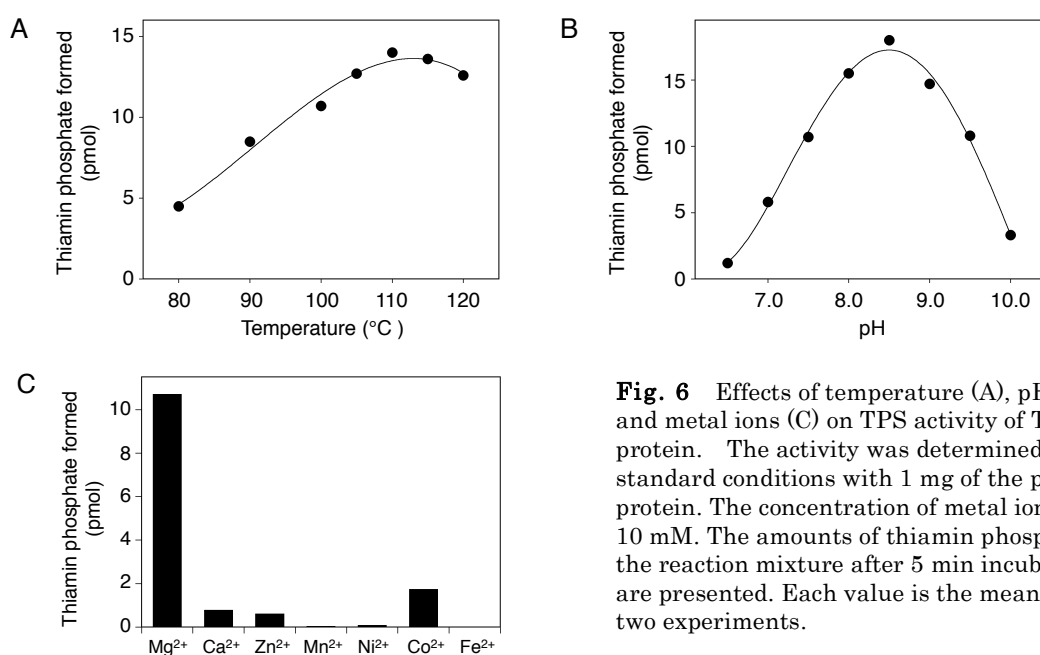


Fig. 6 Effects of temperature (A), pH (B) and metal ions (C) on TPS activity of ThiN protein. The activity was determined under standard conditions with 1 mg of the purified protein. The concentration of metal ions was 10 mM. The amounts of thiamin phosphate in the reaction mixture after 5 min incubation are presented. Each value is the mean from two experiments.

精製した組換え ThiN は 2.1 nmol/mg/min の比活性で HMP-PP、HET-P からチアミンリン酸を生成した。この値は大腸菌²⁰⁾や酵母²¹⁾から精製されたチアミンリン酸合成酵素 (ThiE) の比活性よりも、それぞれ 31 倍および 8 倍低い。また、定常状態速度論解析では、反応初速度は HMP-PP および HET-P いずれの基質濃度に対しても飽和曲線を示した (Fig. 7)。Lineweber-plot から求められた HMP-PP および HET-P に対する K_m 値はそれぞれ 3.2 μM および 0.41 μM であった。この HMP-PP に対する K_m 値は、大腸菌の ThiE (0.85 μM) より 4 倍高く、HET-P に対

する K_m 値はほぼ同程度の値 ($0.40 \mu\text{M}$)²⁰⁾であった。

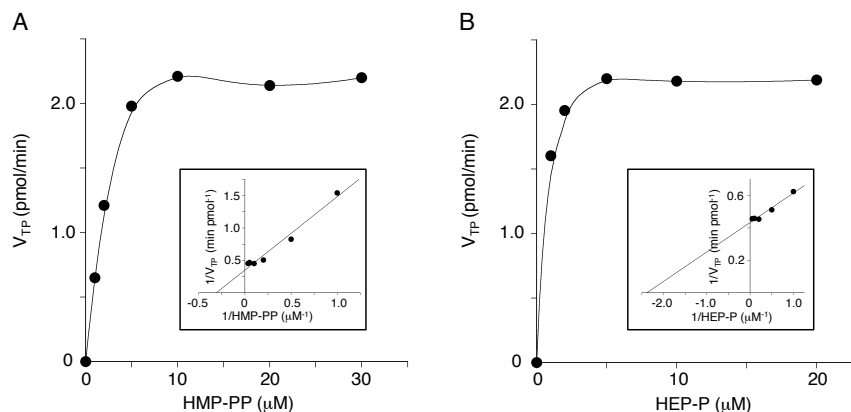


Fig. 7 The TPS activity as a function of substrate concentration. (A) Effect of HMP-PP concentrations on the initial velocity at a constant concentration of HET-P (10 mM). (B) Effect of HET-P concentrations on the initial velocity at a constant concentration of HMP-PP (10 mM). The insets show the Lineweaver-Burk plots of the data.

さらに、ThiE によるチアミンリン酸合成反応のように、ThiN による反応においても HMP-PP と HET-P からチアミンリン酸の生成と共に無機ピロリン酸が生成するの否かを検討した。反応液中のピロリン酸量は、アデニル酸 (AMP) をピロリン酸化させて生じる ATP を定量するルシフェラーゼ共役系によって測定した。Fig. 8 に示すように、ピロリン酸は、チアミンリン酸の生成とほぼ平行して (Fig. 5A)、時間依存的に生成された。この結果は、*thiN* が *thiE* と全く同じチアミンリン酸合成反応を触媒することを示しており、ThiE と ThiN は互いにアナログ酵素 (analog enzyme) であることが明らかとなった。さらに、本ピロリン酸生成確認実験において、一方の基質である HET-P を反応溶液から取り除いてもごく少量のピロリン酸が生産することが観察された。そこで、反応液中タンパク質量を通常の 10 倍に増量して、HET-P 非存在下でも HMP-PP からピロリン酸が遊離することを確認した (Fig. 8)。この結果から、ThiN のチアミンリン酸合成酵素反応は、ThiE で提唱されている機構²²⁾と同様に、HMP-PP から先ずピロリン酸が遊離し、生じた HMP のカルボカチオン中間体が HET-P のチアゾール窒素によって求核攻撃される S_N1 様反応によって進行することが示唆された。

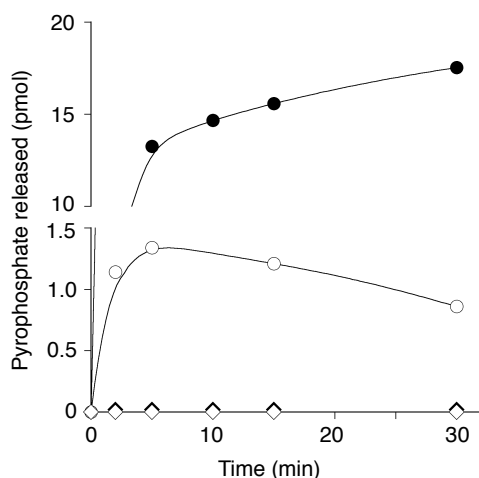


Fig. 8 Inorganic pyrophosphate liberation from HMP-PP in the presence or absence of HET-P. The starting concentration of HMP-PP was 10 μM . The amounts of pyrophosphate in the reaction mixture (50 μl) are shown. Each point is the mean from two experiments. Symbols indicate the following combination of proteins and substrates: closed circle, ThiN (1 μg) in the presence of HET-P (10 μM); open circle, ThiN (10 μg) in the absence of HET-P; closed diamond, ThiN-R320M (10 μg) in the absence of HET-P; open diamond, ThiN-H341L (10 μg) in the absence of HET-P.

最後に、反応生成物を含む種々の化合物のチアミンリン酸合成酵素活性に対する阻害効果を検討した (Table 2)。チアミンリン酸またはピロリン酸を基質の 10 倍の濃度で反応液に加えた時、酵素活性はそれぞれ 59%および 66%ずつ阻害された。この知見は、ThiN の酵素活性が生成物阻害を受けることを示している。一方、リン酸化されていない HMP あるいは HET の共存による影響はわずかであったことから、HMP-PP のピロリン酸および HET-P のリン酸が ThiN の活性中心における基質認識に重要であることが示唆された。なお、大腸菌の ThiE では 1.0 mM ATP 存在下でチアミンリン酸合成酵素活性が 50%阻害されるが²⁰⁾、同濃度の ATP で ThiN の活性は 9.0%しか阻害されず、ATP の影響を受けないことが示唆された。

Table 2. Effect of thiamin derivatives, pyrophosphate and ATP on TPS activity of ThiN. The purified ThiN protein was incubated with 10 mM HMP-PP and HET-P in the absence or presence of an inhibitor. The TPS activity in the absence of an inhibitor is represented as 100%. *The activity was assessed by the amount of released pyrophosphate.

Addition (100 μ M)	Activity (%)
None	100
Thiamin phosphate *	41.1
Pyrophosphate	34.1
Thiamin	82.7
HMP	93.7
HMP-P	81.8
HET	87.7
ATP	87.2
ATP (1 mM)	90.9

第 4 節 ThiN の酵素生成物複合体の構造モデリング

同一の反応を触媒するにもかかわらず ThiN と ThiE のアミノ酸配列に全く相同性が認められないことから、両タンパク質の立体構造に類似性があるのかは興味深い問題である。そこで、タンパク質結晶構造のデータベースを検索すると、幸運なことに、1 件のみ ThiN の結晶構造が HMP-P キナーゼの C 末端領域の構造として、超好熱性古細菌の一種である *Pyrococcus furiosus* のものが登録されていた (PDB ID: 2PB9)。しかし、その構造は 6 個の α -ヘリックスと 9 個の逆平行 β -シートが $\alpha/\beta/\alpha$ と 3 層状になっており、ThiE (例えば *Bacillus subtilis* の ThiE、PDB ID:2TPS) の TIM α/β バレル (樽) 構造²³⁾とは明らかに異なっていた。なお、ThiE には Mg^{2+} や生成物であるチアミンリン酸とピロリン酸との複合体の結晶構造も登録されていたが、上記 ThiN で解析された構造はタンパク質単独のものであった。そこで、ThiN によるチアミンリン酸合成酵素の触媒機構に関する知見を得るために、*P. calidifontis* ThiN の酵素生成物複合体の立体構造を分子モデリングによって構築することにした。*P. furiosus* の ThiN は 184 個のアミノ酸残基からなり、*P. calidifontis* の ThiDN の C 末端領域 (195 アミノ酸) と、44%の一致するアミノ酸を含めて、79%のアミノ酸に類似性が認められたため、モデリングのためのひな型として使用した。分子構造解析ソフト MOE を用いて、数種の自由エネルギー的に安定な酵素生成物複合体構造を構築し、活性中心を形成するアミノ酸残基の保存性とチアミン骨格の立体構造を考慮して 1 つのモデルを選択した。シミュレーションされた *P. calidifontis* の ThiN の酵素生成物複合体の立体構造の全体図と活性中心を Fig. 9 および Fig. 10 にそれぞれ示す。

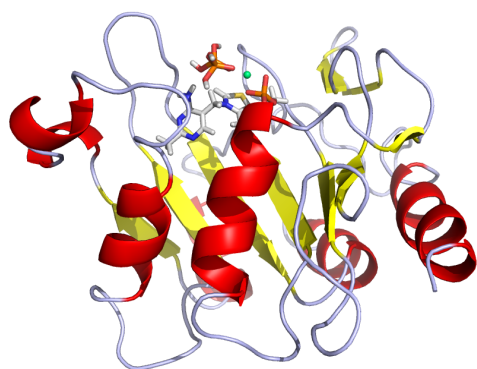


Fig. 9 The simulated model of the overall structure of the *P. calidifontis* ThiN protein in ribbon representation. The reaction products, thiamin phosphate and pyrophosphate are also shown in stick representations with oxygen atoms in red, carbon in gray, nitrogen in blue, sulfur in yellow and phosphorus in orange. A magnesium ion is also shown as a lime-green sphere. This figure was created using the program PyMol .

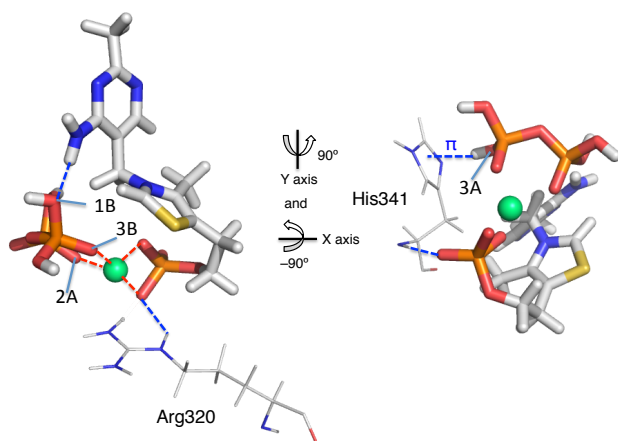


Fig. 10 The simulated enzyme-product interaction of thiamin phosphate and pyrophosphate in the *P. calidifontis* ThiN protein structure. Hydrogen bonds are indicated by blue lines and electrostatic interactions with magnesium ions are shown as red lines. The amino acid residues are shown in line representations and the others are indicated according to the scheme described in the legend of Fig. 9.

予測された配列では、活性中心は、279-298 アミノ酸からなるループの C 末端側、340-350 アミノ酸の α ヘリックスの N 末端、318-320 アミノ酸、393-399 アミノ酸、421-428 アミノ酸からなる各ループによって形成された空洞に位置している (Fig. 9)。ThiE の酵素生成物複合体のように、ピロリン酸とチアゾール部は、ピリミジン部をはさんで反対側に配置される (Fig. 10)。ピロリン酸は活性中心の開口部に位置し、その酸素原子 (3A) は His341 と OH/ π 相互作用によって水素結合し、酸素原子 (1B) はチアミンリン酸のピリミジン部のアミノ基と水素結合している。加えて、ピロリン酸の酸素原子 (2A と 3B) は、 Mg^{2+} イオンと静電的に相互作用している。一方、チアミンリン酸は V 型立体構造²⁴⁾ (Fig. 11) で存在し、そのリン酸の酸素原子は Arg320 の NeH および His341 の主鎖の NH と水素結合している (Fig. 10)。さらに、リン酸部分の酸素原子は、やはり Mg^{2+} イオンと静電的に相互作用している。なお、チアミンの立体構造で最も自由エネルギーの高い状態が V 型であり、熱力学的に最も安定なチアミン構造は F 型である (Fig. 11)。

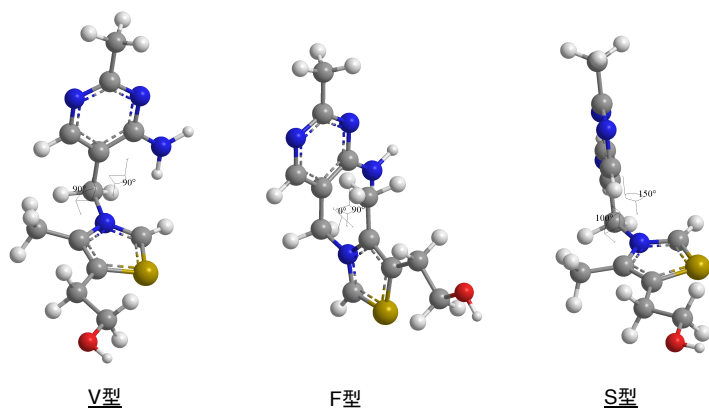


Fig. 11 Crystal structure of thiamin

ThiE に結合しているチアミン構造も V 型であることから、ThiE と ThiN の活性中心の空間構造は相似している可能性が考えられる。

上記モデルでチアミンリン酸およびピロリン酸と水素結合を形成している Arg320 と His341 は ThiN に高度に保存されていた。そこで、部位特異的変異作成によって ThiN の

Arg320 と His341 を他のアミノ酸に置換した変異酵素を作成しその酵素活性を測定した。Arg320 を Met に置換した R320M の精製組換えタンパク質は野生型のチアミンリン酸合成酵素活性のわずか 1 % しか活性を発現せず、His341 を Leu に置換した H341L においては全く活性が検出されなかった。更に、いずれの変異型においても HMP-PP からのピロリン酸の遊離は認められなかった (Fig. 8)。これらの結果から、Arg320 および His341 残基が *thiN* がコードするチアミンリン酸合成酵素の触媒機構に関与していることが明らかになり、活性中心のシミュレーションモデルが妥当である可能性が示唆された。

第 3 章 超好熱性古細菌 *P. calidifontis* のチアミンリン酸キナーゼの酵素学的性質²⁵⁾

第 2 章で、古細菌においてもチアミン合成経路で最初にできるチアミン骨格はチアミンリン酸であることが明らかになった。このチアミンリン酸からチアミンピロリン酸への変換には 2 つの経路が存在することが知られている (Fig. 2)。多くの真正細菌では、チアミンリン酸キナーゼ (ThiL)²⁶⁾ によってチアミンリン酸が直接リン酸化されチアミンピロリン酸が生成する。一方、真核生物や一部の細菌では、チアミンリン酸は一旦脱リン酸化されてチアミンを生じ、次いでチアミンピロホスホキナーゼ (Thi80)²⁷⁾ によってチアミンピロリン酸が生成する。また、外界から取り込まれたチアミンをリン酸化してチアミンリン酸を生成するチアミンキナーゼ (ThiK)²⁸⁾ を持つ真正細菌も存在する (Fig. 2)。本章では、超好熱性古細菌 *P. calidifontis* がチアミンピロリン酸をどのような経路で生合成するのかを決定し、その反応を触媒する酵素の酵素学的性質を検討した。

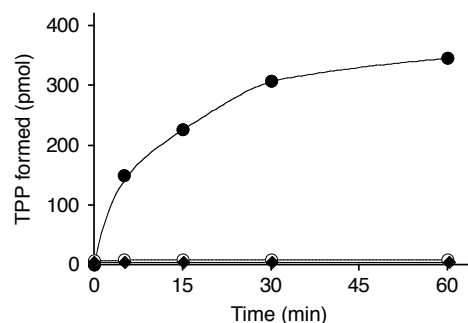
第 1 節 *P. calidifontis* の粗酵素抽出液によるチアミンピロリン酸合成

古細菌においてチアミンピロリン酸がチアミンリン酸のリン酸化によって生成されるか否かを調べるために、チアミンリン酸、ATP、MgCl₂ と *P. calidifontis* の粗酵素抽出液を反応させ、チアミンピロリン酸の生成を測定した。その結果、100°C でインキュベート後、5 分でチアミンピロリン酸が反応液中に検出され、その量は 60 分まで時間と共に増加した (Fig. 12)。この結果は、*P. calidifontis* の粗酵素抽出液の中にチアミンリン酸キナーゼが存在することを強く示唆している。

一方、チアミンリン酸の代わりに基質としてチアミンを用いると、チアミンピロリン酸あるいはチアミンリン酸のいずれも同時間内に検出できず (Fig. 12)、チアミンのリン酸化は本生化学実験で起こらなかったものと思われた。この結果と、チアミンピロホスホキナーゼ遺伝子 (*THI80*) とチアミンキナーゼ遺伝子 (*thiK*) の相同遺伝子が本菌のゲノムに存在しないことから、*P. calidifontis* ではチアミンリン酸キナーゼによるチアミンリン酸のリン酸化がチアミンピロリン酸を合成するための唯一の方法であることが示唆された。*P. calidifontis* はチアミンとそのリン酸エステルを能動輸送で取り込む ABC 輸送系 (ThiBPQ、大腸菌など腸内細菌が持つ)²⁸⁾ の相同分子種を持っているが、チアミンをチアミンピロリン酸あるいはチアミンリン酸に変換するサルベージ酵素 (チアミンピロホスホキナーゼとチアミンキナーゼ、Fig. 2) がいないために、外界のチアミンを直接チアミンピロリン酸合成のために利用できないようである。また、第 2 章で記したように、本菌には HET キナーゼも存在せず、チアゾール環もチアミン合成のために再利用できな

い。チアミン分子は高温環境では不安定で分解されやすいが、ピリミジン環は一般的にチアゾール環よりも安定であるため、チアミン分解に由来するピリミジン部のサルベージ酵素（HMP キナーゼ/HMP-P キナーゼ、Fig. 2）のみが超好熱性古細菌において進化したものと考えられた。

Fig. 12 TPP synthesis from TP or thiamin by the cell-free extract of *P. calidifontis*. The control values obtained in the absence of substrates were subtracted. The amounts of thiamin phosphate in the reaction mixture (50 μ l) are shown. Each value is the mean from two experiments. Symbols indicate the following combinations of substrate and product: closed circle, TPP from TP; open circle, TPP from thiamin; closed diamond, TP from thiamin.

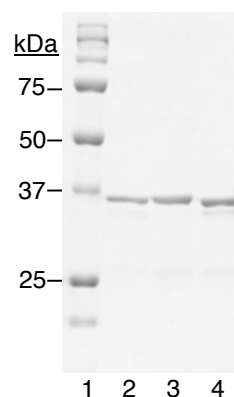


第 2 節 組換え ThiL のチアミンピロリン酸合成能力

古細菌のチアミンリン酸キナーゼも真正細菌のように *thiL* によってコードされていることを確認するため、*P. calidifontis* のゲノム DNA から *thiL* 相同遺伝子 (GeneBank: CP000561) を単離し、そのタンパク質 (293 アミノ酸) を N 末端にヒスチジントグを付加して大腸菌で発現させた。ThiL は可溶性画分に発現され、100 ml の培地から約 30 μ g の精製タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーを用いて得ることができた。SDS-PAGE では、アミノ配列から推定される 34 kDa の位置にほぼ単一のバンドとして検出された (Fig. 13)。さらに、ゲル濾過クロマトグラフィーによって ThiL の相対分子質量は、約 66,000 と推測されたことから、本酵素はホモダイマーとして存在していることが示唆された。

次に、組換え ThiL のチアミンピロリン酸合成能力を 100°C、ATP、MgCl₂ 存在下、チアミンまたはチアミンリン酸を基質に用いて検討した。その結果、チアミンリン酸を基質として用いられた時のみチアミンピロリン酸が時間依存的に生成され、ThiL がチアミンリン酸キナーゼ反応を触媒することが示された。

Fig. 13 SDS-PAGE analysis of the purified proteins. Purified fractions (1 μ g of protein) of histidine-tagged ThiL (lane 2), ThiL-R136M (lane 3) and ThiL-S196A (lane 4) were analyzed using 10% SDS-PAGE followed by Coomassie blue staining. Lane 1 shows the molecular standard proteins (Bio-Rad).



第 3 節 組換え ThiL のチアミンリン酸キナーゼ活性の酵素学的性質

ThiL のチアミンリン酸キナーゼ活性の酵素学的性質を組換え精製酵素を用いて検討した。まず、熱安定性を検討したところ、100°C、15 分の前処理では約 45%の活性が消失し、1 時間の前処理で活性はわずか 20%しか保持されなかった (Fig. 14)。ただし、基質である ATP を共存させると熱安定性が改善されたことから、ATP の存在によって ThiL の適切な折りたたみ構造が高温条件下においても維持されることが示唆された。一方、もう一方の基質であるチアミンリン酸の ThiL

の熱安定性に対する効果は観察されなかった。なお、酵素溶液に 0.5M NaCl や 0.5M KCl を添加しても熱安定性は改善されなかった。

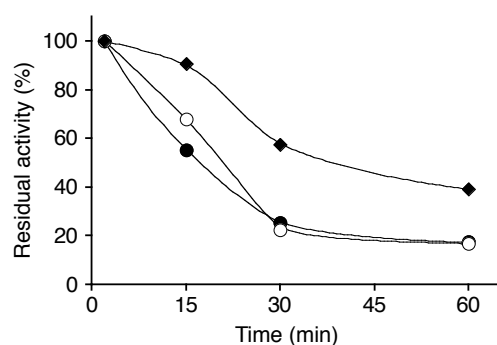


Fig. 14 Effect of temperature and substrates on the stability of ThiL. The enzyme mixture containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, and 10 mM MgCl_2 in the absence (closed circle) or presence of substrate (open circle, 10 mM TP; closed diamond, 1.0 mM ATP) was preincubated at 100°C for the indicated time. Since the thiamin structure is readily hydrolyzed into the pyrimidine and thiazole moieties at high temperatures, every reaction was started by the addition of both substrates. The activity upon 2 min preincubation is indicated as 100%.

次に、ThiL のチアミンリン酸キナーゼ活性に及ぼす温度および pH の影響を検討した。温度を 80°C から 120°C まで増加させると活性も上昇し、100°C と 80°C の活性は、120°C の活性のそれぞれ約 50% と 10% であった。最適 pH は約 7.0 で、pH 8.0 の活性は最も高い活性の約 90% を保持した。 K^+ (0.33M) は大腸菌の精製チアミンリン酸キナーゼの活性を約 5 倍上昇させると報告³⁰⁾されているが、ThiL のチアミンリン酸キナーゼ活性は K^+ (0.1~0.5M) によって影響を受けなかった。以後の実験では、チアミンの安定性を考慮して、 Mg^{2+} 存在下、100°C、pH 7.0 の条件でチアミンリン酸キナーゼ活性を測定することにした。この条件での精製 ThiL の比活性は 108 $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ であり、この値は大腸菌から精製したチアミンリン酸キナーゼ活性の約半分であった³⁰⁾。

組換え ThiL の定常状態速度論解析では、チアミンリン酸および ATP 共に基質濃度に対して飽和曲線を示した。Lineweber-plot から求められたチアミンリン酸および ATP に対する K_m 値はそれぞれ 0.20 μM および 39 μM であった (Fig. 15、Table 3)。これらのチアミンリン酸に対する K_m 値と ATP に対する K_m 値は、それぞれ大腸菌のチアミンリン酸キナーゼの K_m 値 (チアミンリン酸 : 1.1 μM 、ATP : 270 μM) より 6~7 倍低かった³⁰⁾。

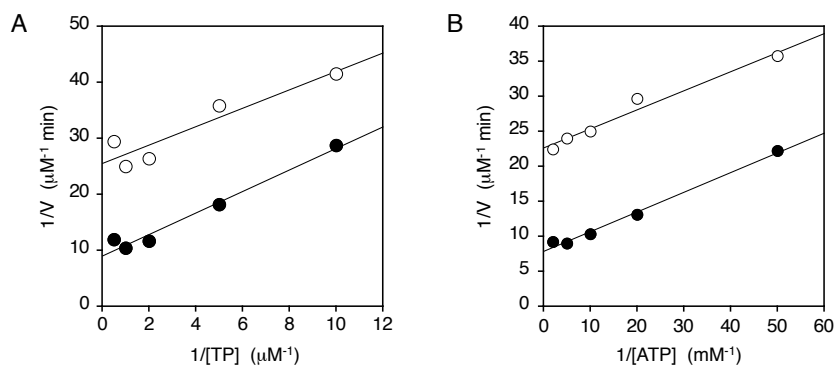


Fig. 15 Inhibition patterns of thiamin phosphate (TP) kinase activity by AMP. The activity was determined with 0.06 μg of the purified ThiL in 80 μl of solution containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, and 10 mM MgCl_2 in the absence (closed circle) or presence of 1.0 mM AMP (open circle). (a) Double-reciprocal plots of the initial velocity versus the TP concentration at a constant concentration of ATP (1.0 mM). (b) Double-reciprocal plots of the initial velocity versus the ATP concentration at a constant concentration of TP (10 mM).

Enzyme	k_{cat} (s^{-1})	K_{m}^{TP} (μM)	$K_{\text{m}}^{\text{ATP}}$ (μM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{TP}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{ATP}}$ ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)
Wild-type	0.063	0.2	39	3.2×10^5	1.6×10^3
R136M	0.092	1.3	280	6.8×10^4	3.3×10^2
S196A	0.006	0.043	0.13	1.4×10^5	4.6×10^4

Table 3. Kinetic parameters for wild-type and mutant ThiL proteins. The catalytic constant k_{cat} was calculated using the equation $k_{\text{cat}} = V_{\text{max}} / [\text{ThiL monomer}]$. Each value is the mean from two experiments.

さらに、チアミンとその前駆体 (HMP、HET、HET リン酸)、およびアデニンヌクレオチド (ADP、AMP) のチアミンリン酸キナーゼ活性に対する阻害効果を検討した。その結果、AMP を基質の 10 倍の濃度で反応液に加えた時、約 40% の活性を阻害された。AMP の阻害様式はチアミンリン酸 ($K_i = 560 \mu\text{M}$)、ATP ($K_i = 530 \mu\text{M}$) いずれに対しても不競合的であり (Fig. 15)、ThiL と基質の複合体が形成されているときに AMP が活性中心とは異なる部位に結合することが示唆されたが、そのことの生理的な意味は不明である。一方、HMP と HET リン酸は 10% しか活性を阻害せず、チアミンと ADP の影響はごくわずかであったことから、ThiL はチアミンのモノリン酸エステルを厳密に認識していることが示唆された。

第 4 節 ThiL の変異作成研究

チアミンリン酸キナーゼの X 線結晶構造として好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* のものが解析され、2 つのアミノ酸残基の触媒反応への関与が推定されている³¹⁾。基質との複合体では ATP の γ -リン酸が Ser209 のヒドロキシ基酸素原子と水素結合しており、生成物との複合体でも Ser209 が TPP の β -リン酸と同様に水素結合し、さらに ADP の β -リン酸が Arg142 のグアニジン基の η 窒素原子のひとつと水素結合している。これら 2 つのアミノ酸残基は真正細菌および古細菌の ThiL に高度に保存されていることから、チアミンリン酸キナーゼの触媒反応への関与が推定される。そこで、*A. aeolicus* の両アミノ酸に相当する *P. calidifontis* ThiL の Arg136 と Ser196 を他のアミノ酸に置換した変異酵素を作成し、それらの定常状態速度論パラメーターを解析した (Table 3)。その結果、Arg136 を Met で置き換えると (R136M)、 k_{cat} 値は野生型酵素の 1.5 倍に増加したが、 $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{ATP}}$ 値は $K_{\text{m}}^{\text{ATP}}$ 値の著しい増加のために野生型酵素の 20% にまで減少した。この結果は、*A. aeolicus* の Arg142 と ATP が相互作用している構造解析の知見と整合性が取れている。一方、Ser196 を Ala で置換した S196A では k_{cat} 値が野生型酵素の 10% にまで低下し、Ser196 はチアミンリン酸キナーゼ活性に重要な役割を持つことが示唆された。また、リン酸化を受けられない Ala への置換でも活性が完全に失われないことから、触媒過程で Ser196 がリン酸化される酵素中間体が生じる可能性はなく、ATP の γ -リン酸はチアミンリン酸に直接転移していることが示唆された。

総括

本研究では、古細菌におけるチアミン生合成経路におけるチアゾール部前駆体を検討し、さらにチアミン骨格の合成とチアミンプロリン酸の合成に関わる酵素の酵素学および構造学的性質を検討した。それらの結果より得られた結論は以下の通りである。

(1) 好塩性古細菌 *Halobacterium salinarum* のチアゾール部の C-2 と窒素原子にグリシンの C-2 と窒素原子が取り込まれ、チロシンは取り込まれないことをトレーサー実験で明らかにした。この結果とゲノム情報から、*H. salinarum* のチアゾール部は酵母型チアゾール合成酵素 (Thi4) により合成されるものと考えられた。

(2) 超好熱性古細菌 *Pyrobaculum calidifontis* の粗酵素抽出液を HMP-PP および HET-P とインキュベートすると、チアミンリン酸が生成したことから、本菌がチアミンリン酸合成酵素を持つと考えられた。また、組換えタンパク質を用いた実験から、*P. calidifontis* の thiDN は N 末側に HMP キナーゼ/HMP リン酸キナーゼ活性を C 末側にチアミンリン酸合成酵素活性を持つ多機能酵素をコードすることを証明した。組換え ThiN のチアミンリン酸合成酵素活性の最適温度は 110°C、最適 pH は 8.5、Mg²⁺ 要求性を示し、HMP-PP と HET-P に対する K_m 値はそれぞれ 3.2 μ M、0.41 μ M であった。また、チアミンリン酸合成酵素の片方の生成物である無機ピロリン酸の生成も確認し、ThiN は真正細菌や真核生物のチアミンリン酸合成酵素である ThiE と全く同じ反応を触媒することを証明した。この結果は、ThiE と ThiN がアナログ酵素 (analog enzyme) であることを示し、起源を異にするタンパク質が同じ反応を触媒する興味深い例である。さらに、超好熱性古細菌 *Pyrococcus furiosus* の ThiN の結晶構造をひな型に用いて、*P. calidifontis* の ThiN 結晶構造を予測した。酵素生成物複合体のシミュレーションでは、Arg320 と His341 がチアミンリン酸のリン酸基やピロリン酸と水素結合していたため、それぞれの変異酵素を作成したところ、ThiN-R320M は野生型の 1 % しか活性を発揮できず、ThiN-H341L では全く活性が認められなかった。それ故、Arg320 と His341 が ThiN のチアミンリン酸合成酵素活性に中心的な役割を持つと考えられた。

(3) *P. calidifontis* の粗酵素抽出液をチアミンリン酸と ATP とインキュベートするとチアミンプロリン酸が生成したことから、本菌がチアミンリン酸キナーゼを持つと考えられた。一方、チアミンプロホスホキナーゼ活性やチアミンキナーゼ活性は検出されず、*P. calidifontis* は外界のチアミンをチアミンプロリン酸生成の基質として利用できないことを明らかにした。組換え ThiL はチアミンリン酸キナーゼ活性を発現し、その最適温度は 120°C 以上、最適 pH は 7.0、Mg²⁺ 要求性を示し、チアミンリン酸と ATP に対する K_m 値はそれぞれ 0.20 μ M、39 μ M であった。また、アデニル酸 (AMP) がチアミンリン酸、ATP いずれに対しても不競合的に本酵素活性を阻害した。一方、好熱性真正細菌 *Aquifex aeolicus* の ThiL の結晶構造から反応への関与が予測される Arg136 と Ser196 の変異酵素を作成したところ、ThiL-R136M は ATP に対する K_m 値が上昇し、ThiL-S196A では k_{cat} 値が野生型の 10% にまで低下した。この結果から、Ser196 がチアミンリン酸キナーゼ活性に中心的な役割を持つと考えられた。

以上のように、古細菌のチアミンのチアゾール前駆体の合成経路は真核生物に類似し、チアミン生合成経路の最終段階であるチアミンピロリン酸の合成酵素は真正細菌と同じであることから、チアミン生合成経路が原始生命体から複雑な進化の過程を経たことが示唆され、本研究がチアミン生合成経路の全容解明に向けて有益な情報を与えるものとする。また、チアミンリン酸合成酵素やチアミンリン酸キナーゼの活性中心の構造についての情報は抗菌剤のデザインを考える上で有益であり、本研究成果は抗菌剤開発に応用されることが期待される。

本研究に含まれる DNA 組換え実験は武庫川女子大学組換え DNA 委員会において承認されている（承認番号 2012-012）。

参考文献

- 1) Friedrich W (1988) Vitamins. Walter de Gruyter, Berlin
- 2) Jurgenson CT, Begley TP, Ealick SE (2009) The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 78, 569-603
- 3) 野坂和人 (2010) チアミンの生合成. ビタミン総合事典 (日本ビタミン学会編) pp. 160-163, 朝倉書店, 東京
- 4) Khare G, Kar R, Tyagi AK (2011) Identification of inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* thiamin phosphate synthase, an important target for the development of anti-TB drugs. *PLoS One*, doi: 10.1371/journal.pone.0022441
- 5) Chan XW, Wrenger C, Stahl K, Bergmann B, Winterberg M, Müller IB, Saliba KJ (2013) Chemical and genetic validation of thiamine utilization as an antimalarial drug target. *Nat Commun*, doi: 10.1038/ncomms3060
- 6) 石野良純 (2009) アーキア：第 3 の不思議な生物. *蛋白質核酸酵素* 54, 101-107
- 7) Sakiyama Y, Kanda N, Higuchi Y, Yoshimura M, Wakaguri H, Takata Y, Watanabe O, Yuan J, Tashiro Y, Saigo R, Nozuma S, Yoshimura A, Arishima S, Ikeda K, Shinohara K, Arata H, Michizono K, Higashi K, Hashiguchi A, Okamoto Y, Hirano R, Shiraishi T, Matuura E, Okubo R, Higuchi I, Goto M, Hirano H, Sano A, Iwasaki T, Matsuda F, Izumo S, Takashima H (2015) New type of encephalomyelitis responsive to trimethoprim/sulfamethoxazole treatment in Japan. *Neurology Neuroimmunology & Neuroinflammation*, doi: 10.1212/NXI.0000000000000143
- 8) Hayashi M, Kijima Y, Tazuya-Murayama K, Yamada K (2015) The biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in the archaeon *Halobacterium salinarum*. *J Nutr Sci Vitaminol* 61, 271-275
- 9) 田鶴谷(村山)恵子、三嶋基弘 (2007) チアミン・チアゾール部の生合成のメカニズムは複雑である. *ビタミン* 81, 10-12
- 10) Chatterjee A, Abeydeera ND, Bale S, Pai PJ, Dorrestein PC, Russell DH, Ealick SE, Begley TP (2011) *Saccharomyces cerevisiae* THI4p is a suicide thiamine thiazole synthase. *Nature* 478, 542-546

- 11) Rodionov DA, Vitreschak AG, Mironov AA, Gelfand MS (2002) Comparative genomics of thiamin biosynthesis in procaryotes. *J Biol Chem* 277, 48949-48959
- 12) Morett E, Korbel JO, Rajan E, Saab-Rincon G, Olvera L, Olvera M, Schmidt S, Snel B, Bork P (2003) Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nat Biotechnol* 21, 790-795
- 13) Grey VL, Fitt PS (1976) An improved synthetic growth medium for *Halobacterium cutirubrum*. *Can J Microbiol* 22, 440-442
- 14) Yamaguchi Y, Rikiishi Y, Yokoyama Y, Ohkouchi N (2009) GC/MS analysis of amino acids ethoxycarbonyl ethyl ester. *Res Org Geochem* 25, 71-83
- 15) Hayashi M, Kobayashi K, Esaki H, Konno H, Akaji K, Tazuya K, Yamada K, Nakabayashi T, Nosaka K (2014) Enzymatic and structural characterization of an archaeal thiamin phosphate synthase. *Biochim Biophys Acta* 1844, 803-809
- 16) Vander Horn PB, Backstrom AD, Stewart V, Begley TP (1993) Structural genes for thiamine biosynthetic enzymes (*thiCEFGH*) in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 175, 982-92
- 17) Nosaka K, Nishimura H, Kawasaki Y, Tsujihara T, Iwashima A (1994) Isolation and characterization of the *THI6* gene encoding a bifunctional thiamin phosphate pyrophosphorylase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 269, 30510-30516
- 18) Kim YS, Nosaka K, Downs DM, Kwak JM, Park D, Chung IK, Nam HG (1998) A *Brassica* cDNA clone encoding a bifunctional hydroxymethylpyrimidine kinase/thiamin phosphate pyrophosphorylase involved in thiamin biosynthesis. *Plant Mol Biol* 37, 955-66
- 19) Onozuka M, Konno H, Kawasaki Y, Akaji K, Nosaka K (2008) Involvement of thiaminase II encoded by the *THI20* gene in thiamin salvage of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 8, 266-275
- 20) Kayama Y, Kawasaki T (1973) Purification and properties of thiamine phosphate pyrophosphorylase of *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 158, 242-248
- 21) Kawasaki Y (1993) Copurification of hydroxyethylthiazole kinase and thiamine phosphate pyrophosphorylase of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of hydroxyethylthiazole kinase as a bifunctional enzyme in the thiamine biosynthetic pathway. *J Bacteriol* 175, 5153-5158
- 22) Reddick JJ, Nicewonger R, Begley TP (2001) Mechanistic studies on thiamin phosphate synthase: Evidence for a dissociative mechanism. *Biochemistry* 40, 10095-10102
- 23) Chiu HJ, Reddick JJ, Begley TP, Ealick SE (1999) Crystal structure of thiamin phosphate synthase from *Bacillus subtilis* at 1.25 Å resolution. *Biochemistry* 38, 6460-6470
- 24) Pletcher J, Sax M, Blank G, Wood M (1977) Stereochemistry of intermediates in

- thiamine catalysis. *J Am Chem Soc* 99, 1396–1403
- 25) Hayashi M, Nosaka K (2015) Characterization of thiamin phosphate kinase in hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum calidifontis*. *J Nutr Sci Vitaminol* 61, 369-374
 - 26) Webb E, Downs D (1997) Characterization of *thiL*, encoding thiamin-monophosphate kinase, in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 272, 15702–15707
 - 27) Nosaka K, Kaneko Y, Nishimura H, Iwashima A (1993) Isolation and characterization of a thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 268, 17440–17447
 - 28) Melnick J, Lis E, Park JH, Kinsland C, Mori H, Baba T, Perkins J, Schyns G, Vassieva O, Osterman A, Begley TP (2004) Identification of the two missing bacterial genes involved in thiamine salvage: thiamine pyrophosphokinase and thiamine kinase. *J Bacteriol* 186, 3660-3662
 - 29) Webb E, Claas K, Downs D (1998) *thiBPQ* encodes an ABC transporter required for transport of thiamine and thiamine pyrophosphate in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem* 273, 8946–8450
 - 30) Nishino H (1972) Biogenesis of cocarboxylase in *Escherichia coli*. Partial purification and some properties of thiamine monophosphate kinase. *J Biochem* 72, 1093-1100
 - 31) McCulloch KM, Kinsland C, Begley TP, Ealick SE (2008) Structural studies of thiamin monophosphate kinase in complex with substrates and products. *Biochemistry* 47, 3810-3821